

PROLYL ENDOPEPTIDASE INHIBITOR

Publication number: JP5331072 (A)
Publication date: 1993-12-14
Inventor(s): MARUYAMA SUSUMU; TANAKA HIDEOKI; MAEDA HIDEKATSU; MITSUYOSHI SHINSUKE +
Applicant(s): AGENCY IND SCIENCE TECHN; SHOWA SANGYO CO +
Classification:
- International: A61K38/55; A61P25/28; A61P3/00; A61P43/00; C07K14/81;
C07K5/10; C07K7/06; C07K7/08; C12N9/99; A61K38/56;
A61P25/00; A61P3/00; A61P43/00; C07K14/81; C07K5/00;
C07K7/00; C12N9/99; (IPC1-7: A61K37/64; C07K5/10;
C07K7/06; C07K7/08; C07K99/00; C12N9/99

- European:

Application number: JP19920160354 19920527
Priority number(s): JP19920160354 19920527

Also published as:

JP3318622 (B2)

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(51)Int.Cl. A 61 K 37/64 C 12 N 9/99 // C 07 K 5/10 7/06 7/08	識別記号 ADD ZNA Z Z	序内整理番号 8314-4C 8018-4H 8318-4H 8318-4H	F I	技術表示箇所
--	------------------------------	--	-----	--------

審査請求 未請求 請求項の数1(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-160354	(71)出願人 000001144 工業技術院長 東京都千代田区霞霞が関1丁目3番1号
(22)出願日 平成4年(1992)5月27日	(74)上記1名の復代理人 弁理士 坂口 畏造 (外1名) (71)出願人 000187079 昭和産業株式会社 東京都千代田区内神田2丁目2番1号
	(74)上記1名の代理人 弁理士 坂口 畏造
	(72)発明者 丸山 進 茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロリルエンドペプチグ…ゼ阻害剤

(57)【要約】

【目的】 新規かつ有用なプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の提供

【構成】 L体のアミノ酸から構成される下記のペプチド及びその翻付加基の少なくとも1種を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤：

Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile及び Thr-Pro-Pro-Val。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L体のアミノ酸から構成される下記ペプチド及びその幾種加成の少なくとも1種を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤:
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-
o-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-
-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile及びThr-Pro-
-Pro-Val

【参考の詳細な説明】

100011

【産業上の利用分野】本発明はプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤に関し、さらに詳しくは近年増加の傾向にあり対策が望まれている痴呆症の予防及び/または治療に有用な医薬品又は食品に利用できることが期待されているプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤に関するものである。

100021

【従来の技術】プロリルエンドペプチダーゼ (EC 3.4.2.1, 26) は、最初、オキシトシン不活性化酵素として 1971 年に Walter 等によってヒト子宮中に発見され、その後、ヒビツジやウシ胎から單一に精製された (Science 173, 827 (1971); Molecular & Cellular Biochemistry 30, 111 (1980); 日本農芸化学会誌 58, 1147 (1984))。また、同様の酵素が *Flavobacterium* 属細菌からも発見されている (J. Biol. Chem. 255, 4786 (1980))。一方、膜内には、バソプレシン及びバソプレシン誘導体 [pGln^4 , Cys^6] AVP-(4-9) の存在が確認されているが、これらのペプチドはステップスルー型受動的阻害法で抑制作用があるとされている (Science 221, 1616 (1983); J. Biol. Chem. 263, 2072 (1988))。

1910 (1955), *nature*, **206**, 270 (1967).
[00003] 芳本と鶴は、記述の調定樹脂とされている脳の海馬部分にプロリルエンドペプチダーゼの高い活性が観られたことと、脳のプロリルエンドペプチダーゼがバソプレシンのようない10アミノ酸程度以下のペプチドによく作用する点に注目し、通常は脳盤でのプロリルエンドペプチダーゼが正常に働いているが何らかの理由で調節機構が外れると、バソプレシンが必要以上に分解され、記憶保持に障害が現れると考え、Z-Gly-Pro- CH_2Cl , Z-Pro-prolinal, Z-Val-prolinal, Boc-Pro-prolinalなどのプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤を合成し、これらが抗健忘作用を示すことを確認した (日本農芸化学会誌 **55** (11), 1147 (1984)、化学と生物 **25** (9), 554 (1987))。また最近では、微生物や食品成分に由来するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤も発見されている (Agriic. Biol. Chem., **55**, 825 (1991)、特開平 **3-31298**, 1990 年農芸化学会年会講演要旨集 p. 119)。

【0004】一方、トウモロコシ、大豆、ニンジンなどの植物は、プロリンを多く含む蛋白質を生産しており

それらには Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu, Pro-Pro-Val-Ty-r-Lys, Pro-Pro-Ile-Tyr-Lys, Pro-Pro-Val-Tyr-Thr, Pro-Pro-Val-His-Lys などアミノ酸 5 ~ 6 種類のペプチドが繰り返し配列として存在している。The Journal of Biological Chemistry 262, 8367 (1987)。特に、トウモロコシ蛋白質はプロラミンを 50~60%、グルテンを 35~40% 含み、主成分であるプロラミンはゼイン (zein) と呼ばれる。ゼインは α 、 β 、 γ の 3 種に分けられ (J. Cereal Sci. 5, 117 (1987))、 γ - ゼイン中には Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu を基本単位とする 6 回繰り返し構造及びプロリンが 1 つ置きに並んだ配列 Pro-Arg-Pro-Gin-Pro-His-Pro-Gin-Pro-His-Pro が含まれている (Nucleic Acids Res. 13 (5), 1495 (1985))。

100051

【危明が解決しようとする課題】本危明はプロリルエンドペチダーゼ阻害作用を有し、従って痴呆症治療及び／または予防薬として、または日常の摂取を通して痴呆症等の症状の予防を図る機能性食品として有用であることが期待される特定のペプチド系プロリルエンドペチダーゼ阻害剤を提供することを目的とする。

[9996]

【課題を解決するための手段】多くのプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤は分子中にプロリリン(Pro)を有し、また幾つかの食用植物は、プロリリンを多く含む蛋白質を生産しており、それらには Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Lys-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Pro-Pro-Pro-Val-Lys-Pro-Pro-Val-His-Lysなどアミノ酸5～6残基のペプチドが繰り返し配列として存在している。本発明者はこれらはこれらの事実より、植物蛋白質を蛋白質質分解酵素(プロテアーゼ)で処理することにより、プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤を安価に大量生産できる可能性があると考え、上記繰り返し配列に関連した種々のペプチドを化学合成し、それらのプロリルエンドペプチダーゼに対する作用を調査した。その結果、下記ペプチドがプロリルエンドペプチダーゼを阻害することを見出した。

【0007】すなわち、本発明はL体のアミノ酸から構成される下記ペプチド及びその翻訳加羥のすくなくとも1種を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤：

Vai-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Vai-His, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile, 及びThr-Pro-Pro-Pro-Ile等。

【0008】ここで酸付加塩は、製薬上許容される酸（無機酸及び有機酸）付加塩、例えば塩酸塩、臭化水素塩、硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、フルマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩等である。

塩、シウ酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等を包含する。また付加する酸の当量は、0当量より大からペプチド中の塩基性アミノ酸残基、His, Arg, Lysの総数+1と等しい当量まで可能である。

【0009】本願の特許請求の範囲中のペプチドは既知の植物蛋白質の配列中に存在するが、そのフラグメントであってかつ本知られていなかった有用性を有する。かかる観点からアンジオテンシン変換酵素阻害剤等として既知のものを除いた下記ペプチドは本発明者らの知る限りにおいて新規化合物である：

His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, L-
eu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gl-
n-Pro-His-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile 及
び Thr-Pro-Pro-Val。

なお、本願の特許請求の範囲のペプチド中、Val-His-Le-
u-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His及びHis-Leu-
Pro-Pro-Pro-Valは公知である（特開平2-3612
7, Agric. Biol. Chem. 53, 1077 (1989)）。

【0010】本発明で使用するペプチドは通常有機化学的な合成方法によりアミノ酸を依存的に導入する方法、または天然蛋白質の酵素加水分解法により製造されるが、また、加水分解酵素の逆反応を利用してペプチド合成法、遺伝子工学的方法等によって製造することも可能である。これまで多くのペプチド合成方法が知られており、例えば泉屋信吉、加藤哲也、青柳卓彦、鷹道典、「ペプチド合成の基礎と実験」丸善（株）に詳しく述べられている。本発明で用いるペプチドはこれらの合成法のいずれかによって、例えばわゆる固相ペプチド合成または液相ペプチド合成によって製造することができる。

【0011】液相ペプチド合成は上述の「ペプチド合成の基礎と実験」に記載されており、それにしたがって、たとえば本ペプチドのC末端に位置するべきアミノ酸であってそのカルボキシル基がベンジル基(BzI)、t-ブチル基(t-Bu)等で保護されたアミノ酸とC末端アミノ酸に隣接して位置するべきアミノ酸であってそのα-アミノ基がt-ブチルオキシカルボニル基(Boc)、ベンジルオキシカルボニル基(z)等で保護されたアミノ酸をジメチルホルムアミド(DMP)、ジメチルアセトアミド等に溶解し、それらをジシクロヘキシカルボジイミド(DC O)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)の存在下室温で一夜反応させることによって行うことができる。ついで生成物のアミノ保護基の常法による除去の後に得られるジペプチドをアミノ保護した第3のアミノ酸と同様に反応してアミノ保護基を除去し、ついで同様な手順を繰り返して本ペプチドを得る。反応させるアミノ酸が反応に関与すべきでないα位以外のアミノ基、グアニジノ基またはイミダゾリル基を有する場合には、これらの基は一般に反応に先立って保護すべきである。アル

コール性ヒドロキシル基の保護基 BzI等を含むし、α位以外のアミノ基の保護基はα-アミノ基の保護基として述べたものを含むし、グアニジノ基の保護基はトシリ基(Tos)等を含むし、イミダゾリル基の保護基はTos等を含む。これらの保護基の導入は常法によって、例えば上述の「ペプチド合成の基礎と実験」に記載されたようにして行うことができる。最終反応の終了後、これらの保護基を除去するが、これらの脱保護は常法によって、例えば上述の「ペプチド合成の基礎と実験」に記述されたようにして行うことができる。例えば、アミノ保護基については Boc はトリフルオロ酢酸(TFA)またはギ酸によって、Z は接触還元によって、カルボキシル保護基については、BzI は、例えば、接触還元によって、t-Bu は TFA または HCl/ジオキサンによって除去することができる。さらに、アルコール性ヒドロキシル基については BzI は、例えば、接触還元または HCl によって、グアニジノ及びイミダゾリル保護基については Tos は Na/Mg または HCl によって除去することができる。

【0012】一方、固相ペプチド合成については、ペプチドシンセサイザー（例えばアプライドバイオシステムズ社によって生産された430 A型ペプチドシンセサイザー）を用いる合成が最近広く用いられている。すなはち、この方法においては基本的には、アミノ基が Boc で保護された α-アミノ酸 (Boc-α-アミノ酸) を、出発物質としての、例えば、L-Pro が結合したフェニルアセトアミドメチル (PAM)樹脂、すなわち、L-Pro-O-CH₂-PAM (アプライドバイオシステムズ社より入手し得る) の N-側からペプチドと Boc の除去の繰り返しによって順次的に延長する。Boc-Arg(Mts) (Mts はメチレン-2-スルホニルである) 及び Boc-L-Glnは中間体として 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)を経由する延長反応に付し、他のBoc-アミノ酸は中間体として DCCを使用する無水物を経由する延長反応に付す。上記 Boc-アミノ酸においては、反応性官能基がある場合には、一般にそれを適当な保護基によって保護するべきである。本発明に関して保護 Boc-アミノ酸の例は Boc-L-Arg(Mts)、Boc-L-Lys(C1-2)(C1-Z)は4-クロロベンジルオキシカルボニルである、Boc-L-Thr(BzI)、Boc-L-Lys(DNP) (DNP は 2,4-ジニトロフェニルである) 等である。

【0013】430 A型ペプチドシンセサイザーを用いる合成系においては、アミノ酸物質以外に以下の試薬及び溶媒を用いる：N, N-ジイソブチルカルバミン (TFA) ニュートラライザー、TFA (Boc 切断)、MeOH (生成した尿素化合物の溶解及び除去)、HOBt (0.5M HOBt/DMP)、DCC (0.5M DCC/ジクロロメタン(DCM)、DCM 及び DMP (溶媒)、ニュートラライザー (70% エタノールアミン、29.5% メタノール) (廃液の中和)。アミノ酸物質及びこれらの試薬及び溶媒を定められた所に装備する。これらの物質の使用はペプチドシンセサイザーによって自動的に行われる。反応温度及び時間の設定も自動的に

なされるが、反応温度は通常室温である。上記手段によってペプチド中の反応性官能基が保護されたペプチド- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{PAM}$ が得られる。上記固相ペプチド合成の実験の操作はアプライドバイオシステムズ社による430 A型ペプチドシンセサイザーズマニュアル (Part Number 900066, Version 1.3B, July 1, 1988) に従って行った。

【0014】得られた反応性官能基が保護されたペプチド- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{PAM}$ を常法に従って、例えば上記の「ペプチド合成の基礎と実験」または430 A型ペプチドシンセサイザーズマニュアルに記述されたようにして、例えば保護基の切断によって生じるカチオンを処理するためのスカベンジャーとしてのチオアニソール及び/またはエタンジチオールの存在下にトリフルオロメタンスルホン酸 (TMSSA) の希釈剤としての TFAと共に用いて処理して樹脂及び保護基を切断しそれによって目的とするペプチドを得る。上記 TMSSA 法において、保護されたペプチド- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{PAM}$ がル-ヒス(DNP) 標基を有する場合には、これをチオフェノールによる DNP の除去の後上記処理に付す。また、例えば (株) ペプチド研究所製のフッ化水素装置に反応性官能基が保護されたペプチド- $\text{O}-\text{CH}_2-\text{PAM}$ 、アニソール及びフッ化水素を導入し、-2 ℃で 1 時間の反応を行った後、フッ化水素の除去とエーテルによる洗浄を行うことにより目的とするペプチドを得ることもできる。

【0015】本発明のプロリルアンドペプチダーゼ阻害剤中の有効成分として使用し得るペプチド中、His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Pro-Val, 及び Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro はトウモロコシ蛋白質 γ -ゼインをズブチリシン、ペプシン、ババインまたは類似の基質を有するプロテアーゼで酵素的にあるいは酸で加水分解することによって得ることができる。本酵素反応は通常単に水中または緩衝液 (例えば、トリス-HCl 緩衝液またはリン酸緩衝液) 中で行う。

【0016】使用する γ -ゼインは γ -ゼイン単独であってもよいし、 γ -ゼインの他に α -ゼイン、 β -ゼインを含む混合物であってもよい。これらのゼインは市販のものでもよいし、またコーンスターの製造過程で得られるもうろこし蛋白質から分離したゼイン、またはそれから公知の手法で分離した (Plant Physiol., 80:623 (1986)) γ -ゼインであってもよい。また特開平2-36127の参考例1に γ -ゼインの製造例が示されている。使用される酵素はズブチリシン、ババインまたはペプシンである。

【0017】蛋白質基質の濃度は搅拌及び混合を行うことが可能である限り、特に限定されないが、搅拌を容易にする、2~20% (v/v) の範囲にあることが好ましい。酵素サーモライシンの添加量はその方値によって要

化するが、蛋白質に基づいて通常 0.01 重量% 以上、好ましくは 0.1~10 重量% であるのが適当である。酵素の一部を反応の途中で加えることも可能である。反応の pH 及び温度は使用酵素の至適温度付近であればよく、ズブチリシンは pH 6~9、温度 30~70°C、ババイン及びペプシンでは pH 5~8、温度 30~60°C が適当である。反応時間は酵素の種類、添加量、反応温度、反応 pH によって異なるため一定ではないが、通常は 1~40 時間程度である。加水分解反応の停止は公知の方法によって、例えば、加水分解物の加熱によるかクエン酸、リンゴ酸等の有機酸、塩酸、リン酸等の無機酸または水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリの添加による pH 变化による酵素の不活性化によって、または限外濾過等を用いる濃過による分離によって行うことができる。

【0018】得られる加水分解物溶液を次いで固相分離 (例えば、遠心分離または離心) に付し、得られる液体を限外濾過、グルーレ過等によって分離して 10000 以下の分子量を有する液体を得る。この液体は本発明の目的ペプチドを含有し、この液体またはその濃縮物 (例えば、凍結乾燥物) をさらに分離して各目的ペプチドを得る。本発明においては上記凍結乾燥物を γ -ゼイン凍結乾燥物と称し、それを用いる場合についてさらに説明する。

γ -ゼイン凍結乾燥物をまずアニオン交換樹脂、例えば弱塩基性アニオン交換樹脂 (例えば、東ソー (株) 製 EAE トヨバール 650M) による処理、またはカチオン交換樹脂、例えば、弱酸性カチオン交換樹脂 (例えば、東ソー (株) 製 SP-トヨバール 650M) による処理に付す。

【0019】 γ -ゼイン凍結乾燥物を最初にアニオン交換樹脂に通す分離方法においては、各ペプチドを直線濃度勾配溶出 (例えば、DEAEトヨバール 650M 使用の場合はトリス緩衝液-適当な濃度の、トリス緩衝液中の NaCl) によって分離する。溶出液をいくつかの画分に取り、各々をグルーレ過 (例えば、セファダックス LH-20 使用)、カチオン交換樹脂処理 (例えば、SP-トヨバール 650M 使用)、逆相 HPLC (例えば、資生堂 (株) 製のオクタデシルシランの商品名であるカプセルバック C₁₈ またはセシエン化学 (株) 製のオクタデシルシランの商品名であるセンショウパック 1251-Y) 等に付して個々のペプチドに分離する。また、簡単には、後記実施例 2 に示される如く、上記 10000 以下の分子量を有する液体を濃縮し、HPLC によって化学合成した本ペプチドと同位置に溶出されてくるペプチドを分取することによって各ペプチドを得ることもできる。

【0020】本ペプチドの酸付加塩は常法によって製造することができる。例えば、酸付加塩は本ペプチドとそれに対し 0 当量より大からそこに含まれる塩基性アミノ酸残基の總数 + 1 当量までの量の酸とを水中で反応させ、ついで生成物を凍結乾燥することによって得ることができる。また、本発明における製造過程で酸付加塩として得られる場合もある。

【0021】本ペプチド及びその酸付加塩はプロリルエンドペプチダーゼ阻害作用を有し、ヒトの痴呆症の治療、予防に有効であると期待される。本ペプチド及びその酸付加塩はそのまま、または通常少なくとも1つの製剤補助剤と製剤組成物にして使用する。本ペプチド及びその酸付加塩は非経口（すなわち、静脈注射、直腸投与等）または経口的に投与し、各投与方法に適した形態に製剤することができる。

【0022】注射剤としての製剤形態は、通常滅菌水溶液を包含する。上記形態の製剤はまた緩衝剤pH調節剤（リン酸水素ナトリウム、クエン酸等）、等張化剤（塩化ナトリウム、グルコース等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル等）等の水以外の他の製剤補助剤を含有することができる。該製剤は細菌保持フィルターを通して滅菌することができる。該製剤はまたは滅菌水溶性組成物として製造し、用時滅菌水等に溶解して使用することもできる。

【0023】経口投与剤は胃腸器官による吸収に適した形に製剤する。錠剤、カプセル剤、懸滴剤、細粒剤、粉末剤は常用の製剤補助剤、例えば結合剤（シリップ、アラビアガム、ゼラチン、ソルビット、トラガカント、ボリビニルブロドリン、ヒドロキシプロピルセルロース等）、賦形剤（ラクトース、スクロース、コーンスター、リン酸カルシウム、ソルビット、グリシン等）、滑潤剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ボリエチレングリコール、シリカ等）、崩壊剤（ポテトスター、カルボキシメチルセルロース等）、湿润剤（タウリル硫酸ナトリウム等）を包含することができる。錠剤は常法によりコーティングすることができる。経口液剤は水溶液等にしたり、ドライプロダクトにすることができる。そのような経口液剤は常用の添加剤例例及び保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、ソルビン酸等）を包含していくてもよい。

【0024】本プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤中の本ペプチドまたはその酸付加塩の量は種々変えることができるが、通常5～100%（w/w）、特に10～60%（w/w）が適当である。本プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の投与量は有効成分として10～200mg/kg/dayが適当である。なお、本ペプチドの急性毒性はLD₅₀（ICR系マウス、経口投与）>3g/kgである。

【0025】また、本ペプチドは多量に摂取しても生体に悪影響を与えない利点を有することから、そのまま、または種々の栄養分等を加えて、もしくは飲食品中に含有せしめて抗痴呆作用、痴呆症予防の機能をもたらす機能性食品、健康食品として食してもよい。すなわち、例えば各種ビタミン類、ミネラル類等の栄養分を加えて、例えば栄養ドリンク、豆乳、スープ等の液状の食品や各種形態の固形食品、さらには粉末状としてそのままあるいは各種食品へ添加して用いることもできる。かかる機

能性食品、健康食品としての本プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤中の有効成分の含有量、摂取量はそれぞれ上記製剤における含有量、投与量と同様でよい。

【0026】

【実施例】次に本発明を実施例により説明する。

実施例1 His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val の合成とプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性

a) His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val の合成

アプライド・バイオシステムズ社製ペプチド合成装置

（4.30 A型）に0.5ミリモルのBoc-Val-O-CH₂-PMI樹脂及び各2ミリモルのBoc-His(Tos), Boc-Leu, Boc-Proを充填し、DCCによる無水対称法によりHis-(Tos)-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-O-CH₂-PMIを合成した。なお、Tosはトリル基を示す。次に、ペプチド研究所製フッ化水素装置に上記合成ペプチド樹脂を導入し、アソニール1.5mlを添加後、フッ化水素10mlを導入した。-2°C、1時間の反応後、フッ化水素を液波下に除去し、ペプチドを無水エーテル、クロロホルムで交互に3回洗浄し、2N酢酸60mlにペプチドを溶解させ、凍結乾燥した。この方法により His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val の白色粉末 130mgを得た。次いで本ペプチドを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製した。

【0027】HPLCによる精製条件を下記に示す。

カラム：メルク社製 LiChosorb RP-SelectB (250 x 4.6mm)

溶出液：0.1%トリフルオロ酢酸を含む3.5～67%アセトニトリルのグラジエント

流速：6ml/min

本ペプチドの各種分析値を後記表1に示す。なお、アミノ酸分析は6N塩酸 110°C、24時間の加水分解後、日立835型アミノ酸分析装置により行った。また、質量分析は日本電子製RM-110型質量分析装置によるFAB-MS法で行った。

【0028】b) Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-P_{ro}-Pro-Val-His, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro, Ly-s-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Val, Thr-Pro-Pro-Val の合成

His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val の合成と同様にアプライド・バイオシステムズ社製ペプチド合成装置（4.30 A型）を使用した DCC による無水対称法により合成し、フッ化水素により保護基と樹脂を切断した。ペプチドの精製条件も前述と同一である。これらのペプチドの各種分析値を後記表1に示す。

【0029】c) プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性の測定

以上のようにして得たペプチドのプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を以下のごとく測定した。

c-1) 微生物由来プロリルエンドペプチダーゼに対する

阻害活性の測定

生化工業(株)より購入した *F. meningosepticum* 由来プロリルエンドペプチダーゼを pH7.0 の 0.1M リン酸緩衝液に溶解し、0.1unit/ml の酵素溶液とした。また、2 mM Z-Gly-Pro-pNA (パッケム社製、Z はベンジルオキシカルボニル基、pNA はパラニトロアニリドを示す) を上記リソチル酸緩衝液(40% ジオキサンを含む) に溶解し基質溶液とした。上記の各種ペプチドの水溶液をそれぞれ 1.5 ml 容量のプラスチックチューブに 40 μ l 入れ、これにリソチル酸緩衝液 80 μ l 、基質溶液 40 μ l を添加し、37°C で 10 分間保温した後、上記プロリルエンドペプチダーゼ溶液 40 μ l を加えよく混合して、37°C で 10 分間の反応を行った。その後、1 N HCl 200 μ l を添加することにより反応を停止させた。反応停止後、酵素反応により遊離していくパラニトロアニリンを HPLC により定量した。HPLC 測定条件は以下の通りである。

【0030】 HPLC 測定条件

カラム： ウォーターズ社製 μ Bondasphere 5 μ C8-300A (150 x ϕ 3.9 mm)

溶出： 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 53% アセトニトリル

検出： 410 nm の吸収

この様な実験を複数行い、阻害率を次の式より算出した。

A-B

$$\text{阻害率} = \frac{A}{A+B} \times 100 \text{ \%}$$

A : 阻害剤を含まない場合のパラニトロアニリンのピーク面積

B : 阻害剤添加の場合のパラニトロアニリンのピーク面積

その結果を後記表 2 に示す。また、阻害率 50% のときのペプチドの濃度を IC₅₀ 値とし、それを後記表 3 に示す。

【0031】 c-2) 牛脳由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性の測定

牛脳アセトバウダーゼ(シグマ社製)25gを10mM EDTA 及

合成ペプチドの分析値

ペプチド ^a	[α] _D ^{25 (°)} (H ₂ O)	アミノ酸分析値		質量分析値 FAB-MS (m/z)
		(組成比)		
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	-192 (C=0.4)	Val 1.00, His 0.98, Leu 1.04, Pro 3.11		659 (M+H) ⁺
Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	-228 (C=0.2)	Leu 1.00, Pro 3.05, Val 1.00, His 1.03		659 (M+H) ⁺
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	-218 (C=0.3)	His 1.00, Leu 1.06, Pro 2.92, Val 1.00		659 (M+H) ⁺
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val ^b	-242 (C=0.1)	His 0.81, Leu 1.09, Pro 3.09, Val 1.00		1299 (M+H) ⁺
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val				

10 mM 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 200 ml に溶解させ、16,000 rpm、20 分の遠心を行い、上清を回収した。次いで、DEAE-トヨバール(東ソー)によるカラムクロマトグラフィーにてプロリルエンドペプチダーゼを部分精製し、0.1unit/ml の酵素溶液とした。また、2 mM Z-Gly-Pro-pNA を上記 Tris-HCl 緩衝液 (40% ジオキサンを含む) に溶解し基質溶液とした。上記の各種ペプチドの水溶液をそれぞれ 1.5 ml 容量のプラスチックチューブに 40 μ l 入れ、これにリソチル酸緩衝液 80 μ l 、基質溶液 40 μ l を添加し、37°C で 10 分間保温した後、上記プロリルエンドペプチダーゼ溶液 40 μ l を加えよく混合して、37°C で 10 分間の反応を行った。以下の測定条件は微生物由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性の測定の場合と同一であり、その結果を後記表 4 に示す。

【0032】 実施例 2 γ -ゼインからの His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val の生成

γ -ゼイン 0.2g を 50 mM Tris-HCl (pH8.2) 12 ml 中に分散させ、これにズブチリシン・カールズベルグ(シグマ社製) 10 mg を加えた。37°C 18 時間の反応後、分子量 10,000 の聚丙烯酰胺(ミリポア社製モルカット)に付して通過する低分子量ペプチドを回収した。これを濃縮して、HPLCにおいて、化学合成した His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val と同位置に溶出されてくるペプチドを分取し回収した。HPLC の条件は以下の通りである。

HPLC の分離条件

カラム： メルク社製 Superspher RP-8 (125 x ϕ 4 mm)

a) 溶出： 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 7~63% アセトニトリル/グリセリン混合液

検出： 210 nm の紫外外吸収

回収したペプチド溶液は、被圧乾固し最終標品とした。

【0033】

【表1】

Leu-Pro-Pro-Pro-Val	-238 (C=0.3)	Leu 1.00, Pro 3.08, 522 (M+H) ⁺ Val 1.04
Pro-Pro-Pro-Val	-242 (C=0.4)	Pro 2.94, Val 1.00 409 (M+H) ⁺
Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-	-203	Pro 6.3, Arg 0.8, 1287 (M+H) ⁺
Pro-Gln-Pro-His-Pro	(C=0.3)	Gln 2.0, His 1.7
Lys-Pro-Pro-Val	-169 (C=0.4)	Lys 0.89, Pro 2.06 440 (M+H) ⁺ Val 1.00
Lys-Pro-Pro-Ile	-167 (C=0.3)	Lys 1.00, Pro 1.94 454 (M+H) ⁺ Ile 1.12
Thr-Pro-Pro-Val	-192 (C=0.5)	Thr 1.00, Pro 2.07 413 (M+H) ⁺ Val 1.00

【0034】

【表2】
P. meningosepticum 由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性

ペプチド	濃度 (μ M)	阻害率 (%)
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	800	31
Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	800	12
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	80
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	400	88
Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	39
Pro-Pro-Pro-Val	400	26
Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro	400	14
Lys-Pro-Pro-Val	400	65
Lys-Pro-Pro-Ile	400	52
Thr-Pro-Pro-Val	400	12

【0035】

【表3】

P. meningosepticum 由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性 (IC₅₀ 値)

ペプチド	IC ₅₀ 値 (μ M)
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	80
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	30
Leu-Pro-Pro-Pro-Val	500
Lys-Pro-Pro-Val	270
Lys-Pro-Pro-Ile	380

【0036】

【表4】

牛膜由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性

ペプチド	濃度 (μ M)	阻害率 (%)
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	400	65
Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	400	68
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	28
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	400	64
Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro	400	71

【0037】

エンドペプチダーゼ阻害剤が提供される。

【発明の効果】本発明によって新規かつ有用なプロリル

フロントページの続き

(51) Int'l. 5
C 0 7 K 99:00

識別記号

序内整理番号

F 1

技術表示箇所

(72)発明者 田中 秀眞
茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内(72)発明者 前田 美賀
茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内(72)発明者 三吉 新介
千葉県船橋市日の出2丁目20番2号 照和産業株式会社総合研究所内